Maisons-Alfort, le 12 août 2013

LE DIRECTEUR GENERAL

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'homologation de la préparation bactérienne BACI-START M4, à base de *Bacillus amyloliquefaciens*, de la société AGROSTAR

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a notamment pour mission l'évaluation des dossiers de matières fertilisantes et supports de culture.
Les avis formulés par l'Agence comprennent :
- *l'évaluation des risques sanitaires que l'utilisation de ces produits peut présenter pour l'homme, l'animal ou l'environnement ;*
- *l'évaluation de leur efficacité sur les végétaux ainsi que celle de leurs autres bénéfices éventuels ;*
- *une synthèse de ces évaluations assortie de recommandations portant notamment sur leurs conditions d'emploi.*

PRESENTATION DE LA DEMANDE

L'Agence a accusé réception d'une demande d'homologation au titre des matières fertilisantes de l'inoculum bactérien BACI-START M4 de la société AGROSTAR, pour laquelle, conformément à l'article R.255-1-1 du Code rural et de la pêche maritime, l'avis de l'Anses est requis.

La présente demande concerne un nouveau dépôt de dossier, suite à l'avis défavorable de l'Agence (24 novembre 2010) et à la décision de refus d'homologation de la Direction Générale de l'Alimentation (10 janvier 2011).

Le présent avis porte sur la préparation bactérienne BACI-START M4, une culture de *Bacillus amyloliquefaciens* mélangée à un support organique, sous-espèce *plantarum* naturellement présente dans les sols, destinée à la stimulation de la croissance racinaire et de la nutrition.

Cet avis est fondé sur l'évaluation par l'Agence du dossier déposé à l'Anses pour cet additif, conformément aux exigences du Code rural et de la pêche maritime, de l'arrêté du 21 décembre 1998 et du guide pour l'homologation des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (document Cerfa 50644#01) et sous réserve de l'utilisation de l'inoculum bactérien dans le respect des bonnes pratiques agricoles (BPA).

SYNTHESE DE L'EVALUATION

Les données prises en compte sont celles qui ont été jugées valides par l'Anses. L'avis présente une synthèse des éléments scientifiques essentiels qui conduisent aux recommandations émises par l'Agence et n'a pas pour objet de retracer de façon exhaustive les travaux d'évaluation menés par l'Agence.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Matières Fertilisantes et Supports de Culture", réuni le 12 juillet 2013, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet l'avis suivant.

CONSIDERANT L'IDENTITE DE L'INOCULUM BACTERIEN

La caractéristique garantie de la préparation bactérienne BACI-START M4 est la suivante (sur produit brut) :

Caractéristique	Valeur garantie selon la déclaration du pétitionnaire
Teneur en bactérie *Bacillus amyloliquefaciens*, souche M4	1.10^9 spores.g^{-1}

Cette préparation bactérienne est proposée pour l'inoculation d'un substrat avant le semis ou la plantation, ainsi que pour l'arrosage de semis ou de plantes en pots après plantation.
Elle se présente sous forme d'une poudre, à diluer dans l'eau avant application.

Usages et conditions d'emploi demandés (formulaire Cerfa 11385 du 3 juillet 2012) :

Cultures	Dose par apport	Nombre d'apports par an	Epoques d'apport
Plantes en pot dans des substrats de culture Plantation de jeunes plants de légumes feuille, plantes aromatiques, fleurs et plantes ornementales annuelles	<u>Préparation d'un support de culture</u> 1 g d'inoculum pour 1 L de support (1 kg pour 1 m^3) <u>Arrosage d'un support de culture</u> <u>Trempage des racines</u> 1 g d'inoculum par L d'eau	2	Semis/plantations et 2 à 4 semaines plus tard

La dose maximale d'apport prise en compte pour l'évaluation de l'innocuité de l'inoculum est de 1000 kg par hectare et par an (en considérant une équivalence de 500 m^3 de support de culture pour 1 hectare).

CONSIDERANT LE MODE DE FABRICATION DE L'INOCULUM BACTERIEN ET LA QUALITE DE LA PRODUCTION

Caractérisation de l'inoculum bactérien et procédé de fabrication

Les spécifications du produit telles que décrites sur le formulaire Cerfa 11385 (arrêté du 21/12/98, annexe I) et la fiche d'information permettent de caractériser ce produit et sont conformes aux exigences réglementaires.

La bactérie du genre *Bacillus amyloliquefaciens* sous-espèce *plantarum*, souche M4, fait partie des microorganismes de la rhizosphère. Il s'agit d'une souche ePGPR (extracellular plant growth promoting rhizobacteria). Cette bactérie ne présente pas de spécificité d'hôte pour les végétaux et n'est pas pathogène pour les cultures.
La souche M4 est déposée dans la banque de microorganismes BCCM / LMG (Bacteria Collection Laboratorium voor Microbiologie de l'Université de Gand, Belgique) sous la référence LMG S-19462. Cette souche est donc entretenue et vérifiée afin de s'assurer qu'aucune dérive génétique n'ait eu lieue au cours des années de production.

La préparation bactérienne BACI-START M4 est élaborée à partir d'une culture de la souche bactérienne sur un substrat carboné stérilisé d'origine végétale, à laquelle est ajouté un extrait de levure. Chaque lot de commercialisation du produit BACI-START M4 correspond à des sacs de 20 kg.

Le système de management de la qualité de la fabrication et de la traçabilité des matières premières et des lots de production est décrit de manière complète et considéré comme satisfaisant. Des analyses de contrôle de la qualité des matières premières et du produit fini (concentration et viabilité des spores) sont effectuées sur chaque lot. La gestion des non-conformités est pertinente.

Les attestations croisées de fourniture et d'approvisionnement sont présentées de manière exhaustive pour ce qui concerne les sources des matières premières. Toute autre provenance correspondrait à un changement de composition et nécessiterait une évaluation complémentaire.

Les matières premières, ainsi que le procédé de fabrication, ne présentent pas de dangers physico-chimiques particuliers.

Constance de composition de l'inoculum bactérien

La constance de composition du produit BACI-START M4 relative à la teneur en spores est convenablement établie pour l'homogénéité et l'invariance. Le pétitionnaire garantit une capacité de revivification des spores pendant deux ans, à l'abri des températures excessives et de toute humidité. Cette durée de stockage est considérée comme acceptable.

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse

La méthode d'échantillonnage utilisée dans le cadre du dossier technique pour constituer les échantillons soumis à l'analyse est pertinente compte tenu de la matrice considérée et des essais réalisés.

L'analyse de caractérisation a été effectuée par un laboratoire externe accrédité sur le programme 108 du COFRAC[1]. Les méthodes analytiques mises en œuvre pour étudier les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de la préparation bactérienne sont précisées. Elles sont normalisées mises à part la méthode du dénombrement des unités formant colonies de la souche bactérienne. Les éléments techniques de cette méthode ont été communiqués et jugés acceptables.

La souche présente dans l'inoculum bactérien BACI-START M4 a été différenciée par le laboratoire LMG de l'Université de Gand (laboratoire accrédité BELAC, organisme belge d'accréditation), selon une méthode d'identification moléculaire basée sur le séquençage de la gyrase A.

Il est rappelé que, aux écarts admissibles près, la conformité de chaque unité de commercialisation du produit aux teneurs garanties sur l'étiquette est requise, et que ces écarts admissibles ne peuvent pas être exploités de manière systématique.

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES A L'INNOCUITE DE L'INOCULUM BACTERIEN

Matières premières et procédé de fabrication

Les matières premières du produit BACI-START M4 autres que le microorganisme ne sont pas considérées comme des substances dangereuses au sens de la réglementation européenne.
L'espèce *Bacillus amyloliquefaciens* n'est pas inscrite à l'annexe III de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail. Il s'agit d'une espèce bénéficiant du statut de présomption d'innocuité reconnue QPS (Qualified Presumption of Safety), tel qu'établi par le comité scientifique de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA).
La souche M4, à l'instar d'autres souches de cette espèce, est susceptible de produire un grand nombre de métabolites secondaires (exo-enzymes, polykétides, lipopeptides, acide indole acétique).
Aucune donnée souche-spécifique n'a été communiquée. Une publication (Krzysztofa Nagórska, 2007) fait état de la production de fengycine par la souche M4, lipopeptide à synthèse non ribosomiale.
Les lipopeptides cycliques sont des molécules amphiphiles présentant des activités cytotoxiques *in vitro* sur les lignées cellulaires et les cellules spermatiques, comparables à celles de la toxine émétique céréulide de *B. cereus*. Cependant, leur structure, ainsi que leur biosynthèse, sont différentes de celles de la céréulide (EFSA Journal (2011), 9(11) : 2445). De plus, l'aptitude de

[1] COFRAC = COmité FRançais d'ACcréditation

ces lipopeptides à provoquer des vomissements n'a pas été prouvée (EFSA Journal (2008) 923, 1-48).
Il convient également de noter qu'au regard des usages revendiqués (usages non alimentaires ou traitement du sol et/ou trempage des racines pour les légumes feuilles) pour la préparation bactérienne BACI-START M4, l'exposition des parties consommables à d'éventuels métabolites est minime.

Les informations relatives au potentiel transfert de gène de résistance aux antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire communiquées par le pétitionnaire ne permettent pas de finaliser totalement la conclusion. Cette problématique est en cours de discussion au niveau européen, des données complémentaires pourront être demandées dès lors qu'un principe d'évaluation aura été finalisé et adopté.

Etude toxicologique de l'inoculum bactérien

Les teneurs en éléments traces métalliques (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) permettent de respecter les critères d'innocuité pour l'homologation des matières fertilisantes dans les conditions d'emploi préconisées.
Les teneurs en composés traces organiques (fluoranthène, benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène et 7 PCBs) n'ont pas été déterminées. Toutefois, compte tenu de la nature du produit et de sa composition, l'analyse de ces micropolluants n'est pas nécessaire.
Les analyses microbiologiques effectuées montrent que le produit respecte les critères en vigueur pour l'homologation des matières fertilisantes.

Les études de toxicité aiguë mises en œuvre sur la préparation bactérienne BACI-START M4 conduisent aux résultats suivants :

- chez le rat, une DL50 par voie orale (OCDE 423) et par voie cutanée (OCDE 402) supérieure à 2000 $mg.kg^{-1}$ p.c. ;
- chez le lapin, absence d'effet irritant cutané (OCDE 404) et oculaire (OCDE 405).

Considérant les informations toxicologiques disponibles sur les matières premières ainsi que les résultats d'études expérimentales, la classification toxicologique proposée pour la préparation bactérienne BACI-START M4 est « non classé » au sens du Règlement (CE) n°1272/2008.

En raison des effets potentiellement sensibilisants des microorganismes, des gants, des vêtements de protection appropriés et un masque filtre anti-aérosol (de type EN149 FFP3 ou équivalent) devront être portés. De plus, l'étiquetage de la préparation BACI-START M4 devra mentionner « Contient *Bacillus amyloliquefaciens*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation ».

Résidus et sécurité du consommateur

Compte tenu de la nature du produit BACI-START M4 et des usages revendiqués, il n'est pas attendu de risque pour le consommateur.

Devenir dans l'environnement et écotoxicité de l'inoculum bactérien

La classification du produit BACI-START M4 vis-à-vis de l'environnement, déterminée au regard de la classification des matières premières ainsi que de leur teneur dans le produit fini, est non classé selon le Règlement (CE) n°1272/2008.

Aucun test d'écotoxicité ni test visant à mesurer l'impact environnemental du produit BACI-START M4 n'a été effectué.
Une revue bibliographique concernant les microorganismes *Bacillus* et plus particulièrement l'espèce *B. amyloliquefaciens* a été soumise et indique qu'aucun effet indésirable sur les écosystèmes ou sur la faune et la flore n'a été rapporté.

Sur la base des informations disponibles, il n'est pas attendu d'effet néfaste sur les organismes aquatiques et terrestres suite à l'apport du produit BACI-START M4 selon les usages revendiqués.

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES A L'EFFICACITE DE L'INOCULUM BACTERIEN

Caractéristiques biologiques de l'inoculum bactérien

Effets revendiqués

La préparation bactérienne BACI-START M4 est proposée pour stimuler la croissance racinaire et la nutrition.

Eléments relatifs à l'efficacité intrinsèque et au mode d'action

Les effets de la préparation bactérienne BACI-START M4 sont basés sur l'activité de la bactérie du genre *Bacillus amyloliquefaciens*, qui fait partie des souches bactériennes PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), reconnues pour promouvoir le développement racinaire des plantes lorsqu'elles sont en contact avec les racines.

L'application du produit BACI-START M4 permet d'inoculer le système racinaire des végétaux avec la souche promotrice de la croissance radiculaire.

Les modalités d'action des *Bacillus* sont des phénomènes complexes, non encore totalement élucidés, faisant intervenir des mécanismes d'action directs et indirects de synthèse de métabolites, d'induction enzymatique, de solubilisation du phosphore, d'activation de réaction de défense, etc.
Les trois publications communiquées par le pétitionnaire précisent l'état des connaissances relatives aux actions de promotion de la croissance des végétaux des souches du genre *Bacillus*. Ces dernières agiraient directement sur le développement racinaire du fait :
- soit de la sécrétion d'une molécule ou d'un groupe de molécules, mises à disposition de la plante. Sont cités dans la littérature des antibiotiques, des auxines, des cytokinines et gibbérellines, des déaminases, des enzymes cellulases ou encore des composés organiques volatiles ;
- soit d'une meilleure accessibilité à des composés nutritifs dans la rhizosphère grâce à des sidérophores ou des solubilisations de phosphore ;
- soit d'une action combinée selon les deux modalités précédentes, simultanée ou au cours de phases différentes du développement du végétal.

Essais d'efficacité

Deux essais (2011) dans les conditions d'emploi préconisées ont été mise en œuvre dans le but de mesurer les effets de l'inoculum bactérien BACI-START M4 associé à un substrat de rempotage sur le développement d'une plante annuelle fleurie, le Pélargonium et sur celui d'un légume feuille, la salade (Batavia). Le pétitionnaire précise que « les essais d'efficacité ont été réalisés dans des conditions de substrats désinfectés pour pouvoir juger de l'effet fertilisant du produit », conformément aux recommandations de l'avis de l'Agence (avis du 24 novembre 2010).

Les plants de Pélargonium ont été cultivés en pot placés sous une serre chauffée (12°C jour / 10°C nuit), et contenant un substrat de culture non fertilisé et stérilisé par un passage à l'étuve (une heure à 120°C). L'inoculum a été incorporé à la dose de 1 g par litre de substrat 48 heures avant le rempotage. Six modalités ont été testées, avec et/ou sans inoculum et/ou fertilisation azotée (1,25 ou 2,5 $kg.m^{-3}$). Les paramètres agronomiques suivants ont été suivis : observation visuelle du développement du système racinaire 10, 15 et 64 jours après le rempotage ainsi que la mesure de la hauteur des plantes, de leur diamètre et du poids de la partie aérienne 64 jours après le rempotage.
La présence de l'inoculum bactérien dans le substrat de culture carencé en éléments nutritifs est sans effet significatif sur la croissance et le développement du Pélargonium. En revanche, avec un substrat fertilisé à demi-dose ou à pleine dose, l'apport de l'inoculum bactérien BACI-START M4 entraîne une augmentation significative de l'enracinement et du poids de la partie aérienne des plantes, alors qu'aucun effet significatif n'est mesuré sur la hauteur et le diamètre des plantes.

Mises à part les températures de la serre (7℃ jour / 5℃ nuit), les conditions d'expérimentation de l'essai sur salade ont été identiques à celles établies pour l'essai Pélargonium. Les mesures ont été réalisées 18 et 50 jours après le rempotage. Par ailleurs, le pétitionnaire signale que les salades ont fait l'objet d'une attaque cryptogamique un mois après le rempotage. L'origine et l'espèce du champignon ne sont pas précisées.
L'apport de l'inoculum BACI-START M4 conduit à un effet significativement positif sur la vitesse d'enracinement de la Batavia cultivée sur un substrat fertilisé ou non, 18 jours après le rempotage. En fin d'essai (50 jours après le rempotage), aucune différence significative relative à l'enracinement des plants de salade n'est observée entre les différentes modalités.
Compte-tenu de la perturbation des conditions expérimentales engendrée par l'attaque d'un bio-agresseur un mois après le rempotage, les mesures du poids des salades au terme de l'essai ne peuvent pas être considérées comme des données pertinentes de démonstration de l'efficacité de l'inoculum BACI-START M4.

Conclusions sur le mode d'emploi de l'inoculum bactérien

Le mode d'emploi indiqué est suffisant pour permettre une bonne utilisation du produit.
Le pétitionnaire recommande de ne pas utiliser le produit sur des sols asphyxiés et à des températures inférieures à 12℃.
Le produit peut être mélangé à tous supports de culture, fertilisants organiques ou enrobés minéraux.

Revendications et dénomination de classe et de type retenues

Seule la revendication relative à la stimulation de la croissance racinaire peut-être retenue. Les observations visuelles relatives au développement du système racinaire des plantes devront toutefois être confirmées par des données chiffrées sur les paramètres agronomiques appropriés.

Aucune mention relative au phénomène d'élicitation ou résistance systémique induite ainsi qu'à la réduction de l'incidence ou la gravité de diverses maladies (champignon, virus, nématode, bactérie, insecte) ne devrait être faite sur l'étiquette, les emballages, fiches techniques et commerciales.

La dénomination de classe et de type proposée est la suivante : « Préparation bactérienne » - « Inoculum de *Bacillus amyloliquefaciens* sous-espèce *plantarum*, souche M4 (LMG S-19462) ».

CONCLUSIONS

En se fondant sur les données soumises par le pétitionnaire et évaluées dans le cadre de cette demande, ainsi que sur l'ensemble des éléments dont elle a eu connaissance, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que :

A. La caractérisation ainsi que la constance de composition de la préparation bactérienne BACI-START M4 sont convenablement établies.

Le dénombrement des spores de l'inoculum est retenu comme élément de caractérisation pour le marquage obligatoire. La souche bactérienne sera également précisée.

B. L'innocuité de la préparation bactérienne BACI-START M4 pour les usages demandés est considérée comme conforme aux exigences réglementaires.
Néanmoins, des informations complémentaires relatives au potentiel transfert de gène de résistance aux antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire pourront être demandées dès lors qu'un principe d'évaluation aura été finalisé et adopté au niveau européen.

Classification du produit, phrases de risque et conseils de prudence

Les données disponibles permettent de considérer que le produit est non classé au sens du Règlement (CE) n°1272/2008.

Précautions d'emploi

La mention « Contient *Bacillus amyloliquefaciens*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » devra figurer sur l'étiquette.

Port d'un masque filtre anti-aérosol (de type EN149 FFP3 ou équivalent), de gants et de vêtements de protection appropriés.

C. Le niveau d'efficacité du produit est satisfaisant pour les usages de stimulation de la croissance racinaire.

La dénomination de classe et de type proposée est la suivante : « Préparation bactérienne » - « Inoculum de *Bacillus amyloliquefaciens* sous-espèce *plantarum*, souche M4 (LMG S-19462) ».

Usages et conditions d'emploi retenus (en l'état actuel de l'évaluation)

Cultures	Dose par apport	Nombre maximal d'apports par an	Epoques d'apport
Plantes en pot dans des substrats de culture Plantation de jeunes plants de légumes feuille, plantes aromatiques, fleurs et plantes ornementales annuelles	Préparation d'un support de culture 1 g d'inoculum pour 1 L de support (1 kg pour 1 m^3) Arrosage d'un support de culture Trempage des racines 1 g d'inoculum par L d'eau	2	Semis/plantations et 2 à 4 semaines plus tard

Aucune mention relative au phénomène d'élicitation ou résistance systémique induite ainsi qu'à la réduction de l'incidence ou la gravité de diverses maladies (champignon, virus, nématode, bactérie, insecte) ne devrait être faite sur les supports d'information et de communication (étiquette, emballages, fiches techniques et commerciales, site internet, etc.).

En conséquence, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet un avis **favorable** à la mise sur le marché de la préparation bactérienne BACI-START M4 et propose une homologation dans les conditions d'étiquetage et d'emploi précisées ci-dessus.

Données post-homologation

Les compléments d'information suivants devront être apportés au plus tard 6 mois avant l'échéance de l'autorisation de mise sur le marché, sauf indication contraires précisées ci-dessous :

Type	Compléments post-homologation requis
Analyses	Effectuer au moins tous les six mois, sur des échantillons représentatifs de l'inoculum tel qu'il est mis sur le marché, des analyses portant au moins sur : - les éléments figurant sur l'étiquetage (dénombrement des spores) ; - les microorganismes totaux, Entérocoques, *Escherichia coli, Clostridium perfringens, Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, Nématodes, Levures et moisissures, *Aspergillus, Pythium*.

	Les analyses doivent avoir été effectuées par un laboratoire accrédité par le COFRAC sur le programme 108 ou par un organisme équivalent (norme NF ISO 17025). Les méthodes d'analyse doivent être en priorité celles du programme 108 du COFRAC. L'emploi de toute autre méthode doit être justifié et il convient d'utiliser en priorité les méthodes normalisées ou standardisées. Le cas échéant, fournir la méthode utilisée, sa justification ainsi que les éléments nécessaires à sa validation. Dans tous les cas, les références des méthodes employées doivent être précisées. Il conviendrait que le responsable de la mise sur le marché conserve à 4°C pendant les 12 mois suivant la mise sur le marché un échantillon représentatif de chacun des lots, en vue d'éventuelles analyses complémentaires rendues nécessaires par une information tardive sur les matières premières ou un éventuel problème constaté par les utilisateurs du produit.
Efficacité	Fournir, **dans un délai de 4 ans**, des essais complémentaires de démonstration de l'effet de la préparation bactérienne sur le développement du système racinaire pour les différents types de cultures revendiquées. Des données chiffrées de mesure des paramètres agronomiques appropriés (longueur et poids des racines, nombre de ramifications, etc.), devront être communiquées. Les rapports d'étude, les données brutes et l'analyse statistique des résultats sont également requis.

Mots-clés : BACI-START M4 - préparation bactérienne - *Bacillus amyloliquefaciens* sous-espèce *plantarum* - souche M4 - LMG S-19462 - FSIM.

Marc MORTUREUX